

# Avaliação do papel da glutathione e do vacúolo como mecanismos de defesa contra a toxicidade induzida pelo chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Rita Rodrigues Perez

Outubro 2012

Orientação: Professor Doutor Eduardo Jorge Valente Soares

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
RAMO DE TECNOLOGIAS DE PROTEÇÃO AMBIENTAL

**Avaliação do papel da glutathione e do vacúolo como  
mecanismos de defesa contra a toxicidade induzida  
pelo chumbo na levedura *Saccharomyces cerevisiae***

**Rita Rodrigues Perez**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO  
PORTO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
TECNOLOGIAS DE PROTEÇÃO AMBIENTAL

**ORIENTADOR:** Professor Doutor Eduardo Jorge Valente Soares

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ISEP



## **Agradecimentos**

Considerando este trabalho como resultado final de um intenso processo de crescimento pessoal e intelectual, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram nas diversas fases da minha vida.

Primeiramente, agradeço ao Professor Doutor Eduardo Soares, meu orientador, por me ter dado a oportunidade de trabalhar em microbiologia, por acreditar nas minhas aptidões e me ter transmitido todos os conhecimentos necessários para a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto e ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB) por terem disponibilizado as instalações e equipamentos necessário para a realização do trabalho de investigação.

Gostaria de expressar o meu sincero agradecimento à Doutora Manuela Machado por todo o apoio que sempre me prestou e pela paciência demonstrada no decorrer deste trabalho.

A todos os meus amigos, que partilharam comigo a vida de estudante, pelos bons momentos partilhados.

À Sofia Santos, uma amiga que certamente levarei para a vida.

Aos meus irmãos e aos meus pais, que me possibilitaram a ingressão no ensino superior de forma a concretizarem um sonho de menina.

Por fim, um especial agradecimento ao Norberto Ribeiro que nunca me deixou desistir do curso, que sempre me apoiou, mesmo às vezes não entendendo os meus sentimentos. Obrigada pelo carinho, pela amizade e pela paciência.

A todos, Obrigada!



## Sumário

A presença de metais pesados no meio ambiente deve-se, principalmente, a atividades antropogénicas. Ao contrário do Cu e do Zn, que em baixas concentrações são essenciais para o normal funcionamento celular, não se conhece para o chumbo nenhuma função biológica. O chumbo apresenta efeitos tóxicos, é considerado possível agente carcinogénico, sendo classificado como poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel da glutathione e do vacúolo, como mecanismos de defesa, contra os efeitos tóxicos induzidos pelo chumbo, usando como modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A levedura *S. cerevisiae* quando exposta a várias concentrações de chumbo, durante 3h, perde a viabilidade e acumula espécies reativas de oxigénio (ROS). O estudo comparativo da perda de viabilidade e acumulação de ROS em células de uma estirpe selvagem (WT) e de estirpes mutantes, incapazes de produzir glutathione devido a uma deficiência no gene *GSH1* ( $\Delta gsh1$ ) ou *GSH2* ( $\Delta gsh2$ ), mostrou que as estirpes  $\Delta gsh1$  ou  $\Delta gsh2$  não apresentavam um aumento da sensibilidade ao efeito tóxico do chumbo. No entanto, o tratamento de células da estirpe WT com iodoacetamida (um agente alquilante que induz a depleção de glutathione) aumentou a sensibilidade das células à presença de chumbo. Pelo contrário, o enriquecimento em GSH, através da incubação de células WT com glucose e uma mistura de aminoácidos que constituem a GSH (ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina), reduziu o stress oxidativo e a perda de viabilidade induzida por chumbo.

A importância do vacúolo, como mecanismo de defesa, foi avaliada através da utilização de um mutante sem qualquer estrutura vacuolar ( $\Delta vps16$ ) ou de mutantes deficientes na subunidade catalítica A ( $\Delta vma1$ ) ou B ( $\Delta vma2$ ) ou no proteolípido - subunidade c ( $\Delta vma3$ ) da V-ATPase. As células da estirpe  $\Delta vps16$  apresentaram uma elevada suscetibilidade à presença de chumbo. As células das estirpes deficientes na subunidade A, B ou c da V-ATPase, apresentaram uma maior perda de viabilidade, quando expostas a chumbo, do que as células da estirpe WT, mas menor do que a da estirpe  $\Delta vps16$ .

Em conclusão, os resultados obtidos, no seu conjunto, sugerem que a glutathione está envolvida na defesa contra a toxicidade provocada por chumbo; todavia, a glutathione, por si só, parece não ser suficiente para sustentar o stress oxidativo e a perda de viabilidade induzida por chumbo. O vacúolo parece constituir um importante mecanismo de defesa contra a toxi-

cidade provocada por chumbo. A V-ATPase parece estar envolvida na compartimentação de chumbo no vacúolo.

**Palavras chave:** chumbo; glutathione; *Saccharomyces cerevisiae*; stress oxidativo; toxicidade de metais pesados; vacúolo; V-ATPase.

## Abstract

The presence of heavy metals, in the environment, is mainly due to anthropogenic activities. On the contrary to copper and zinc, which are essential, at low concentrations, for the normal cell function, lead is a non essential metal for biological functions. Lead is toxic, considered as probable human carcinogen and classified as priority pollutant by the US Environmental Protection Agency.

The aim of the present work was to evaluate the role of the glutathione and the vacuole, as defence mechanisms, against the toxic effects lead-induced, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a cell model.

Yeast cells of *S. cerevisiae*, exposed to different lead concentrations, for 3h, lost the cell viability and accumulated intracellularly reactive oxygen species (ROS). Yeast cells unable to produce glutathione due to the deficiency in *GSH1* ( $\Delta gsh1$ ) or *GSH2* ( $\Delta gsh2$ ) genes were compared with wild type (WT) cells to the loss of cell viability and ROS accumulation Pb-induced. It was verified that  $\Delta gsh1$  and  $\Delta gsh2$  cells did not display an increased sensitivity to lead toxic effects, compared with WT cells. However, the depletion of glutathione, by treatment of WT cells with iodoacetamide (an alkylating agent), enhanced the sensitivity to Pb. In contrast, the incubation of WT cells with glucose and an amino acids mixture constituting glutathione (L-glutamic acid, L-cysteine and glycine) reduced the oxidative stress and the loss of proliferation capacity Pb-induced.

The importance of the vacuole, as a defence mechanism, was evaluated by using a mutant without any vacuolar-like structure ( $\Delta vps16$ ) or mutants deficient in the catalytic subunit A ( $\Delta vma1$ ) or B ( $\Delta vma2$ ) or in proteolipid - subunit c ( $\Delta vma3$ ) of V-ATPase. Cells of  $\Delta vps16$  strain exhibited a high sensitivity to the presence of lead. When exposed to lead, cells of strains deficient in subunit A, B or c of V-ATPase, presented a higher loss of viability than the cells of the WT strain, but lesser than the strain  $\Delta vps16$ .

In conclusion, the obtained results suggest that intracellular GSH is involved in the defence against the Pb-induced toxicity; however, it seems to be not enough to sustain the oxidative stress and loss of cell viability Pb-induced. The vacuole seems to play an important role, as defence mechanism against the toxicity lead-induced. The V-ATPase seems to be involved in the compartmentalization of lead in the vacuole.

**Keywords:** glutathione; heavy metal toxicity; lead; oxidative stress; *Saccharomyces cerevisiae*; vacuole; V-ATPase.





## Índice Geral

Agradecimentos .....	iii
Sumário.....	v
Abstract.....	vii
Índice Geral.....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas .....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	xv
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1 Metais Pesados.....	3
1.1 Impacto dos metais pesados nos seres vivos.....	3
1.2 Uso e origem de contaminação por chumbo .....	4
1.3 Efeitos tóxicos provocados pelo chumbo.....	6
1.3.1 Em seres humanos .....	6
1.3.2 Na levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	7
2 <i>Stress</i> Oxidativo .....	7
2.1 Geração de espécies reativas de oxigénio .....	7
2.2 Alvos moleculares e celulares de ROS.....	9
2.3 Mecanismos de Defesa .....	9
2.3.1 Sistema de defesa enzimático.....	10
2.3.2 Sistema de defesa não enzimático .....	11
2.4 Sistema de desintoxicação de metais: o papel do vacúolo .....	13
2.4.1 V-ATPase: função e estrutura.....	14
Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....	17

2.1	Microrganismos utilizados .....	19
2.2	Condições de crescimento dos microrganismos.....	19
2.3	Avaliação da toxicidade do chumbo .....	20
2.4	Determinação do número de células .....	20
2.5	Determinação da produção de ROS.....	21
2.6	Avaliação da toxicidade do chumbo após tratamento das células com iodoacetamida.....	21
2.7	Avaliação da toxicidade após tratamento das células com uma mistura de aminoácidos constituintes da GSH.....	22
2.8	Visualização do vacúolo .....	22
2.9	Reprodutibilidade dos resultados.....	22
Capítulo 3 – Resultados e Discussão .....		23
3.1	Avaliação do papel da GSH.....	25
3.1.1	Efeito da deficiência dos genes <i>GSH1</i> e <i>GSH2</i> durante a exposição a chumbo.....	25
3.1.2	Tratamento com iodoacetamida e aminoácidos constituintes da GSH.....	29
3.2	Avaliação do papel do vacúolo .....	32
Capítulo 4 – Conclusões e trabalho futuro.....		37
4.1	Conclusões .....	39
4.2	Sugestões para trabalho futuro .....	40
Referências Bibliográficas .....		41

## Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo regenerativo da glutathione (adaptado de Grant 2001).....	11
Figura 2 - Estrutura da glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine).....	12
Figura 3 - Formação da glutathione (adaptado de Grant 2001).....	12
Figura 4 - Exemplo de transportadores que medeiam a acumulação e desintoxicação de metais tóxicos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Wysocki e Tamás 2010). ....	14
Figura 5 - $H^+$ -ATPase vacuolar (V-ATPase). A V-ATPase é constituída pelo domínio associado com a membrana (V0) e o domínio citosólico (V1). A hidrólise de ATP no domínio V1 origina a translocação de prótons através do domínio V0 (adaptado de Cipriano et al. 2008).....	15
Figura 6 - Comparação da suscetibilidade ao chumbo da estirpe selvagem (WT) e mutantes deficientes em GSH ( $\Delta gsh1$ e $\Delta gsh2$ ). As células, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas com diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. A viabilidade foi estimada por contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de cinco experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). .26	
Figura 7 - Visualização da acumulação intracelular de ROS. As células de levedura selvagem (WT) foram incubadas com $H_2DCFDA$ , durante 20 minutos, e posteriormente colocadas na ausência (a e c) ou na presença (b e d) de $1000 \mu mol/L$ de $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. Fotografias de fluorescência (c e d); fotografias de contraste de fase das mesmas células (a e b).....	27
Figura 8 - Produção de ROS em células do tipo selvagem (WT) e $\Delta gsh1$ . As células foram incubadas com $H_2DCFDA$ , durante 20 min, e posteriormente colocadas na ausência ou na presença de $1000 \mu mol/L$ de $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. Os valores apresentados correspondem à média de quatro medidas de fluorescência; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida duas vezes.....	28
Figura 9 - Impacto de iodoacetamida e uma mistura de enriquecimento contendo os aminoácidos constituintes da GSH na viabilidade das células expostas a $Pb(NO_3)_2$ . As células da estirpe selvagem (WT), em fase exponencial de crescimento, foram incubadas com $1 mmol/L$ de iodoacetamida ou com uma mistura que contém glucose, ácido L-	

glutâmico, L-cisteína e glicina, durante 1h, a 25 ° C, antes da exposição a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , durante 3h. Os valores apresentados correspondem à média de três experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).....30

Figura 10 - Impacto da iodoacetamida e de uma mistura de aminoácidos constituintes da GSH na acumulação intracelular de ROS em células expostas a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . As células da estirpe selvagem (WT), foram tratados e expostos a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , tal como descrito na figura 9. A produção de ROS foi avaliada com  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , como descrito na figura 8. Os valores apresentados correspondem à média de quatro leituras de fluorescência; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida quatro vezes. ....31

Figura 11 – Visualização do vacúolo utilizando a sonda CMAC-Arg. Células da estirpe selvagem (WT) (a) e células da estirpe  $\Delta vps16$  (sem vacúolo) (b). ....32

Figura 12 - Comparação da suscetibilidade ao chumbo da estirpe selvagem (WT) e estirpes mutantes vacuolares ( $\Delta vps16$ ,  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$ ). As células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com diferentes concentrações de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , durante 3h. A viabilidade foi estimada por contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de quatro experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).....34

Figura 13 – Avaliação da suscetibilidade ao chumbo em estirpe selvagem (WT) e estirpes mutantes vacuolares ( $\Delta vps16$ ,  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$ ). As células, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas com diferentes concentrações de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , durante 3h e efetuado o plaqueamento, em YEPD – agar, de 5  $\mu\text{L}$  de diluições sequenciais. O crescimento ocorreu durante 3-5 dias, a 25°C.....34

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Níveis máximos de contaminação para concentrações de metais pesados no ar, na água e no solo de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos (adaptado de Duruibe et al. 2007). .....	6
Tabela 2 – Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas na presente dissertação.....	19



## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

Acr3p - Transportador vacuolar de As (III)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADP – Adenosina difosfato

ARH - Administrações das regiões hidrográficas

ATP – Adenosina trifosfato

ARN – Ácido ribonucleico

Cta1 – Cataláse localizada nos peroxissomas

Ctt1 – Cataláse localizada no citosol

Crs5p - Metalotioneína

Cup1p - Metalotioneína

DO<sub>600</sub> – Densidade ótica a 600 nm

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

GR - Glutathione redutase

GRXs - Glutarredoxinas

GPXs - Glutathione peroxidases

GSH – Glutathione na forma reduzida

Gsh1 –  $\gamma$ -glutamyl-cisteína-sintetase

Gsh2 - Glutathione sintetase

GSSG - Glutathione na forma oxidada

GST - Glutathione S-transferase

H<sub>2</sub>DCFDA – Diacetato de 2', 7' – diclorodihidro fluoresceína

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (Sigla em Inglês)

MT - Metalotioneína



NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

NQA - Normas de qualidade ambiental

OH<sup>•</sup> – Radical hidroxilo

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigénio singuleto

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Anião superóxido

Pca1p - Transportador de Cd (II)

PBB - Polibromobifenilo

PBDE - Éter de difenilo polibromado

PRXs – Peroxirredoxinas

ROS – Espécies reativas de oxigénio (Abreviatura em Inglês)

rpm – Rotações por minuto

SODs - Superóxido dismutases

Sod1 - Superóxido dismutase situada no citosol dependente de Cu e Zn

Sod2 - Superóxido dismutase situada na matriz mitocondrial dependente de Mn

UFC – Unidade formadora de colónia

URF – Unidade relativa de fluorescência

US-EPA - Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

V-ATPase – H<sup>+</sup> ATPase vacuolar

Ycf1p - Transportador vacuolar da família ABC

## **Capítulo 1 - Introdução**



## **1 Metais Pesados**

A designação de metal pesado refere-se a qualquer elemento metálico que tenha uma elevada densidade, cerca de 4 g/cm<sup>3</sup> ou 5 vezes maior que a densidade da água, e que seja tóxico para os seres vivos, mesmo em baixas ou moderadas concentrações (Duruibe et al. 2007).

### **1.1 Impacto dos metais pesados nos seres vivos**

Os metais desempenham um importante papel em diversos processos bioquímicos, nomeadamente no metabolismo celular. O cálcio, o cobalto, o níquel, o crómio, o cobre, o ferro, o magnésio, o potássio, o sódio e o zinco são exemplos de metais que são fundamentais para a atividade celular. Estes elementos podem ser requeridos pelas células para intervir nas reações redox e na estabilização molecular. Podem também ser utilizados como micronutrientes, uma vez que fazem parte de várias enzimas (Viau 2005). Contudo, alguns metais, como é o caso do cádmio, chumbo e mercúrio, não apresentam quaisquer funções biológicas conhecidas, não sendo essenciais ao metabolismo celular, pelo que podem apresentar um alto potencial de toxicidade para os seres vivos (Van der Heggen et al. 2010).

Nas células humanas, o excesso ou a deficiência de iões metálicos, pode gerar várias doenças como a anemia (por deficiência de ferro), a hemocromatose (por acumulação de ferro nos tecidos devido ao seu excesso no organismo), a doença de Wilson (por acumulação de cobre no cérebro e fígado) e a doença de Menkes (por deficiência de cobre) (Avery 2001). A perturbação da homeostasia do ferro e cobre parece desempenhar um papel importante na etiologia de distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Jomova e Valko 2011).

Os metais têm a capacidade de deslocar outros metais essenciais para o metabolismo celular dos seus sítios de ligação, competindo entre si (Avery 2001). Os metais podem ainda estimular a formação de espécies reativas de oxigénio (Avery 2001). O *stress* oxidativo, a interferência na reparação do ADN, a quebra na proliferação celular e a possível morte celular são alguns efeitos tóxicos que os metais podem exercer sobre os seres vivos (Wysocki e Tamás 2010).

## **1.2 Uso e origem de contaminação por chumbo**

O chumbo constitui um metal abundante na crosta terrestre e pode ser encontrado livre ou em associação com outros elementos. Nos solos, plantas e água, o chumbo é comumente encontrado em quantidades vestigiais (Cheng e Hu 2010). O chumbo apresenta uma massa atômica de 207,21 u. Funde-se a 327°C, emite vapores perto dos 550°C e entra em ebulição quando atinge 1740°C (Stahlschmidt 2010).

A poluição causada pelo chumbo deve-se, principalmente, às atividades antropogénicas, uma vez que este metal tem uma vasta e intensa utilização pelos seres humanos (Cheng e Hu 2010), tendo-se verificado um aumento dos níveis ambientais nos últimos três séculos (ATSDR 2007). A mineração, a fundição, os diversos usos industriais, a incineração de resíduos, a queima de carvão e as emissões provenientes da gasolina com chumbo são os principais fatores que contribuem para a poluição causada por este metal (ATSDR 2007; Cheng e Hu 2010).

Dado o seu ponto de fusão ser relativamente baixo e a sua ductilidade elevada, este metal é particularmente atrativo para a indústria de armamento, nomeadamente para a produção de munições. Porém, estima-se que a maior utilização do chumbo esteja associada à indústria automóvel, na produção de baterias. O chumbo está presente como pigmento em tintas, corantes e esmaltes cerâmicos. O chumbo, sob a forma de tetraetil e tetrametilchumbo foi muito utilizado como aditivo da gasolina. Porém, no final da década de 90, início dos anos 2000, foi proibido nos EUA e União Europeia. Atualmente este aditivo encontra-se banido na maioria dos países industrializados (ATSDR 2007).

O solo pode apresentar uma elevada contaminação por chumbo devido a diversos fatores, tais como: lascas de tintas com chumbo provenientes dos edifícios, pontes e outras estruturas e poeiras oriundas da queima da gasolina com chumbo. As partículas libertadas durante a combustão caem sobre o solo, ficando fortemente aderidas na sua superfície (ATSDR 2007).

O chumbo é considerado um dos metais mais tóxicos, podendo penetrar no corpo humano através da ingestão de água e comida ou por inalação de ar contaminado com chumbo (Duruibe et al. 2007; Cheng e Hu 2010). O contato da pele com pó e terra contendo chumbo também pode ser uma forma de contaminação, porém em menor grau. Uma outra forma de contaminação pode ser devido ao uso de cosméticos e corantes capilares contendo acetato de chumbo (ATSDR 2007).

A utilização do chumbo tem provocado inúmeros casos de intoxicações ocupacionais e

ambientais. Foi a partir da revolução industrial, no século XVIII, que a utilização deste metal atingiu grande escala e as concentrações de chumbo atmosférico começaram a crescer, contribuindo para a assimilação e acumulação de chumbo no sangue das pessoas expostas ao metal. Os riscos para a saúde decorrentes da exposição ocupacional ou ambiental são uma vertente preocupante da sociedade (Stahlschmidt 2010).

Atualmente existem várias regulamentações nos EUA e na União Europeia a fim de reduzir ou mesmo eliminar o uso deste metal pesado em aditivos de gasolina, tintas e sistemas de distribuição de águas, de modo a reduzir a libertação deste poluente. O chumbo é considerado um elemento prioritário pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos (US-EPA 2006). De acordo com a Diretiva Europeia 2002/95/CE (ROHS), desde 1 de Julho de 2006, os novos equipamentos elétricos e eletrónicos colocados no mercado não devem conter chumbo, mercúrio, cádmio, crómio hexavalente, polibromobifenilo (PBB) e/ou éter de difenilo polibromado (PBDE). Isto porque, a maioria dos equipamentos elétricos e eletrónicos, quando terminam o seu fim de vida são vulgarmente largados em lixeiras, fazendo com que a água da chuva ácida dissolva o chumbo e outras substâncias perigosas destes equipamentos, misturando-se diretamente nos lençóis freáticos. Desta forma, as administrações das regiões hidrográficas (ARH) devem aplicar às águas superficiais abrangidas pelo decreto-lei nº 103/2010 de 24 de Setembro, as normas de qualidade ambiental (NQA) para as substâncias prioritárias estabelecidas na tabela da parte A do Anexo III do mesmo decreto-lei, de que o chumbo e seus componentes fazem parte.

Em relação à exposição de trabalhadores de processos industriais que utilizem chumbo como elemento de trabalho, também existe regulamentação. De acordo com o Decreto – Lei nº 24/2012 de 6 de Fevereiro, Anexo I, qualquer trabalhador só poderá estar exposto durante oito horas por dia a  $0,15 \text{ mg/m}^3$  de chumbo metálico e respetivos componentes iónicos.

Existe também níveis de tolerância máximos admitidos pela US-EPA no que diz respeito às concentrações de metais pesados no ar, na água e no solo. Segundo esta entidade, a concentração de chumbo admitida nos solos não deve exceder os 420 mg/L. A concentração máxima de chumbo na água potável deverá ser 0,01 mg/L e nos suportes de vida aquáticos 0,0058 mg/L.

Tabela 1. Níveis máximos de contaminação para concentrações de metais pesados no ar, na água e no solo de acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos (adaptado de Duruibe et al. 2007).

<b>Metal pesado</b>	<b>Máxima concentração no ar (mg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Máxima concentração no solo (mg/L)</b>	<b>Máxima concentração na água potável (mg/L)</b>	<b>Máxima concentração em suportes de vida aquáticos (mg/L)</b>
Cd	0,1 - 0,2	85	0,005	0,008
Pb	--	420	0,01 (0,0)	0,0058
Zn	1,5	7500	5	0,766
Hg	--	< 1	0,002	0,05
Ca	5	Tolerável	50	Tolerável > 50
Ag	0,01	--	0	0,1
As	--	--	0,01	--

### 1.3 Efeitos tóxicos provocados pelo chumbo

#### 1.3.1 Em seres humanos

O chumbo é um elemento tóxico, não essencial, que se acumula no organismo dos seres humanos. Este metal pesado afeta adversamente vários órgãos e sistemas, sendo particularmente críticas as alterações subcelulares e os efeitos neurológicos. Nos seres humanos, o chumbo afeta o sistema hematopoético e a homeostase do cálcio. O chumbo inibe ou mimetiza a ação do cálcio e interage com os grupos sulfidrílo das proteínas modificando a sua forma biológica. Este metal pode afetar o sistema nervoso periférico, levando a disfunções psicológicas e neurocomportamentais; afeta ainda de modo adverso o coração, por via indireta, através do sistema nervoso autónomo. O chumbo causa nefropatia com disfunção tubular renal reversível e nefropatia intersticial irreversível (Moreira e Moreira 2004). Adicionalmente, o chumbo provoca um grave efeito teratogénico, disfunção das articulações e dos sistemas de reprodução, danos graves no sistema gastrointestinal (Duruibe et al. 2007) e pequenos aumentos da pressão arterial, essencialmente em pessoas de meia-idade e idosos (ATSDR 2007). Em grávidas, níveis elevados de exposição a este metal pode provocar aborto espontâneo. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) defende que o chumbo inorgânico é, provavelmente, um composto cancerígeno para os seres humanos. Contudo, ainda não foi possível classificar os compostos de chumbo orgânico quanto ao seu nível de carcinogenicidade (ATSDR 2007).

### 1.3.2 Na levedura *S. cerevisiae*

As células de levedura, em particular de *S. cerevisiae*, constituem um modelo adequado para o estudo dos efeitos tóxicos do chumbo. São células eucarióticas, facilmente manipuláveis no laboratório e apresentam o genoma completamente sequenciado (Goffeau et al. 1996).

O chumbo provoca na levedura *S. cerevisiae* a perda da capacidade proliferativa (Suh et al. 1999; Soares et al. 2002, 2003; Chen e Wang 2007; Sakamoto et al. 2010), na ausência de alteração da permeabilidade membranar (Van der Heggen et al. 2010; Bussche e Soares 2011). O chumbo inibe a atividade metabólica das leveduras, avaliada através da capacidade de processar a sonda fluorescente FUN-1 (Van der Heggen et al. 2010); adicionalmente, o chumbo impede a assimilação de catião amónio, reduz a razão ADN/ARN (Chen e Wang 2007), provoca o dano do ADN (Yuan e Tang 1999) e o aparecimento de alterações morfológicas nucleares (Bussche e Soares 2011). A morte celular induzida por chumbo é um processo ativo que requer a participação do metabolismo celular. A presença de chumbo provoca nas células da levedura *S. cerevisiae* um forte *stress* oxidativo (acumulação de espécies reativas de oxigénio) o qual poderá ser o desencadeador da morte celular por apoptose (Bussche e Soares 2011).

## 2 Stress Oxidativo

### 2.1 Geração de espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são espécies químicas resultantes do metabolismo celular, derivadas da ativação ou redução do oxigénio molecular. Algumas destas espécies reativas, como os radicais hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) e hidroperóxilos (derivados da peroxidação de lípidos) são frequentemente denominados de radicais livres por apresentarem um ou mais eletrões desemparelhados (Herrero et al. 2008).

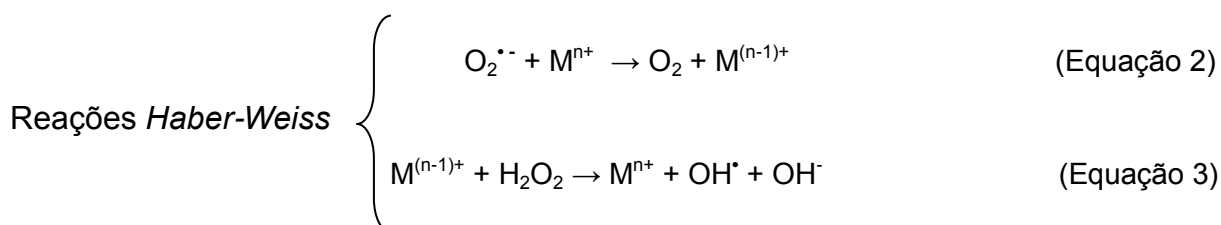
O oxigénio molecular ( $\text{O}_2$ ) contém dois eletrões desemparelhados nas orbitais moleculares de maior energia; contudo, não é muito reativo uma vez que ambos os eletrões têm o mesmo *spin*. Quando um desses eletrões é excitado e muda o seu *spin*, a espécie resultante transforma-se num poderoso oxidante, o oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ). Por outro lado, quando o oxigénio é reduzido produz-se o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) que é um intermediário relativamente estável (equação 1). Todavia, o anião superóxido é o precursor da maioria das



espécies reativas de oxigénio e um mediador nas reações em cadeia oxidativas (Herrero et al. 2008).



As reações de Fenton (reação 3) ou Haber-Weiss (reações 2 e 3) são catalisadas por metais redox-ativos (por exemplo, o cobre, o ferro e o crómio), originando radicais altamente reativos como os radicais hidroxilo, partindo do anião superóxido e do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Avery 2001).



A presença das espécies reativas de oxigénio nas células pode ser benéfica ou não, dependendo da concentração presente. Quando estas espécies se encontram em concentrações moderadas são consideradas uma defesa contra agentes infecciosos; são ainda importantes nos sistemas de sinalização celular e na indução da divisão celular. Contudo, quando a acumulação das espécies reativas de oxigénio ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre um fenómeno conhecido como *stress* oxidativo. O *stress* que as células sofrem pode ser resultado de um aumento excessivo na produção de ROS, uma diminuição da capacidade de defesa celular antioxidante ou, ainda, a junção de ambos (Mariani 2008).

A origem das espécies reativas de oxigénio pode ser endógena e/ou exógena, sendo que as fontes endógenas estão relacionadas com a respiração celular. Ou seja, são gerados a partir da perda de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial, como consequência da respiração aeróbia, sendo que existe alguma controvérsia relativamente à quantidade de espécies produzidas nos diferentes locais da cadeia (Herrero et al. 2008). Em relação às fontes exógenas podem salientar-se a exposição à radiação solar, exposição a radiação ionizante, toxinas ambientais, agentes químicos e metais pesados. Desta forma é

necessário que as células possuam defesas antioxidantes, processos de eliminação de ROS e de reparação de danos oxidativos (Mariani 2008).

## **2.2 Alvos moleculares e celulares de ROS**

O cobre e o ferro podem iniciar, diretamente, os danos oxidativos, promovendo a propagação de reações de peroxidação lipídica. Desta forma, as principais moléculas celulares, como os lípidos, as proteínas e o ADN são altamente suscetíveis ao ataque oxidativo e degradação por parte das espécies reativas de oxigénio (Avery 2001, 2011). Outros potenciais mecanismos, indiretos, pelos quais os metais pesados podem promover danos nas células dizem respeito à inibição de enzimas de defesa antioxidante, a depleção de glutathione e de proteínas que contêm grupos sulfidrílo e a perturbação física da membrana lipídica, levando à sua peroxidação (Avery 2001). O resultado global da peroxidação lipídica é a conversão de lípidos insaturados a hidroperóxidos lipídicos, polares, que podem causar um aumento da fluidez da membrana devido à perturbação dos fosfolípidos. Estes efeitos podem influenciar bastante as funções da membrana. Uma extensa peroxidação lipídica pode mesmo levar à desintegração da membrana e, consequentemente, morte celular (Avery 2011).

As proteínas podem mostrar diferentes suscetibilidades ao ataque oxidativo de ROS, o que pode estar associado à composição variável em grupos sulfidrílo. Certos aminoácidos, como a cisteína, metionina e histidina, são particularmente propensos à oxidação. A acumulação de aminoácidos oxidados leva a mudanças conformacionais das proteínas e à sua inativação. As espécies reativas de oxigénio induzidas pelos metais também podem afetar as proteínas modificando a cadeia lateral. Além disso, as proteínas da membrana podem ser oxidadas por produtos produzidos na peroxidação lipídica (Avery 2001, 2011).

A maioria dos metais são agentes mutagénicos fracos e não danificam o ADN diretamente. Contudo, indiretamente, podem desencadear genotoxicidade interferindo com os processos de reparação deste (Wysocki e Tamás 2010).

## **2.3 Mecanismos de Defesa**

Os seres vivos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, os quais podem ser agrupados em mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Avery 2011). Estes mecanismos são capazes de transformar ROS em espécies menos reativas, ou até mesmo,

de as neutralizar.

### 2.3.1 Sistema de defesa enzimático

O sistema enzimático é formado por três grupos de enzimas: superóxido dismutase, catalase e peroxidase.

As enzimas superóxido dismutase catalisam a transformação de dois aniões superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (de acordo com a equação 4), isto é, um radical muito oxidante numa espécie menos reativa. A levedura *S. cerevisiae* possui duas SODs: uma no citosol, dependente de Cu e Zn (Sod1) e, outra, situada na matriz mitocondrial, dependente de Mn (Sod2) (Herrero et al. 2008).



As catalases são hemoproteínas contendo quatro grupos heme, os quais apresentam elevada especificidade para o peróxido de hidrogénio. As catalases reduzem o peróxido de hidrogénio a água e oxigénio, de acordo com a equação 5. A levedura *S. cerevisiae* possui duas catalases: Cta1, localizada nos peroxissomas, e Ctt1, localizada no citosol (Herrero et al. 2008).



As peroxidases reduzem peróxidos orgânicos e inorgânicos, usando como centro ativo os grupos tiol das cisteínas. Este grupo de enzimas é constituído pelo subgrupo das glutathione peroxidases (GPXs), que utilizam glutathione (GSH), e pelo subgrupo das peroxirredoxinas (PRXs), que usam tioredoxina como redutor. Dentro das glutathione peroxidases existem dois tipos: as GPXs clássicas e as glutathione reductases (GRXs) (Herrero et al. 2008).

Outra enzima que age em conjunto com as GPXs é a glutathione reductase (GR). Esta enzima não atua diretamente na remoção de espécies reativas de oxigénio, mas é de elevada importância pois regenera a glutathione da sua forma oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) usando NADPH (Figura 1) (Grant 2001; Herrero et al. 2008).

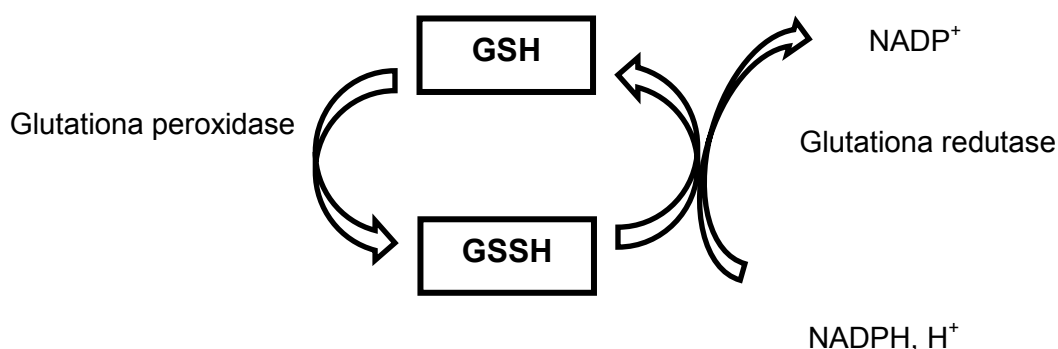


Figura 1 - Ciclo regenerativo da glutathione (adaptado de Grant 2001).

### 2.3.2 Sistema de defesa não enzimático

No que diz respeito aos sistemas de defesa não enzimáticos podem salientar-se a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (Herrero et al. 2008), a vitamina C (ácido L-ascórbico), as metalotioneínas (MT) e a glutathione (GSH) (Jamieson 1998).

A vitamina C e E são moléculas de baixo peso molecular, com atividade redox. A vitamina E é considerada um antioxidante fraco quando atua fora da membrana celular. Porém, quando introduzida na bicamada lipídica membranar é de elevada importância, uma vez que consegue quebrar a reação em cadeia da peroxidação lipídica (Rodrigues e Moraes 2002).

Quanto à vitamina C, comprovou-se a sua atividade antioxidante em mutantes deficientes na enzima superóxido dismutase. A presença desta vitamina prolonga o tempo de vida médio dos mutantes, comparativamente à estirpe parental (Herrero et al. 2008). Recentemente, foi demonstrado que a adição de ácido ascórbico reduz, acentuadamente, o *stress* oxidativo em células de levedura expostas a chumbo (Bussche e Soares 2011).

As metalotioneínas são uma família de proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína, com propriedades antioxidantes e com capacidade de se ligar a vários íons metálicos (Jamieson 1998). Em *S. cerevisiae* existem dois tipos de MT: Cup1p e Crs5p. Cup1p liga-se a Cu, Cd e Zn. A expressão de Cup1p é fortemente induzida por elevados níveis de Cu. A principal função de Cup1p parece estar associada à desintoxicação de Cu. Contudo, também é possível que proteja da toxicidade do Cd. A MT Crs5p é mais rica em cisteína que a Cup1p, e tem capacidade de se ligar a Cu, Cd e especialmente a Zn (Wysocki e Tamás 2010).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo constituído por ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina (Figura 2). É sintetizada em duas etapas que requerem ATP. Na primeira etapa, a enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase (Gsh1) catalisa a formação do dipeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteína a partir do ácido L-glutâmico e da L-cisteína. Na segunda etapa, a enzima glutathiona sintetase (Gsh2) junta a glicina ao dipeptídeo anteriormente formado (Figura 3) (Sies 1999; Grant 2001).

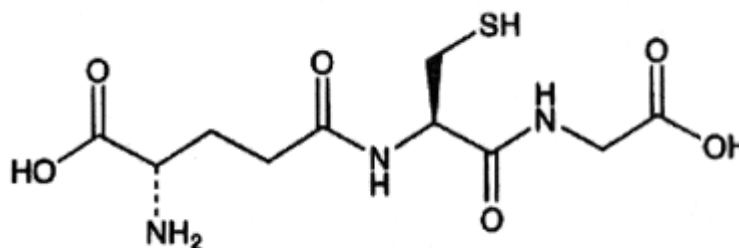


Figura 2 - Estrutura da glutathiona ( $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina).

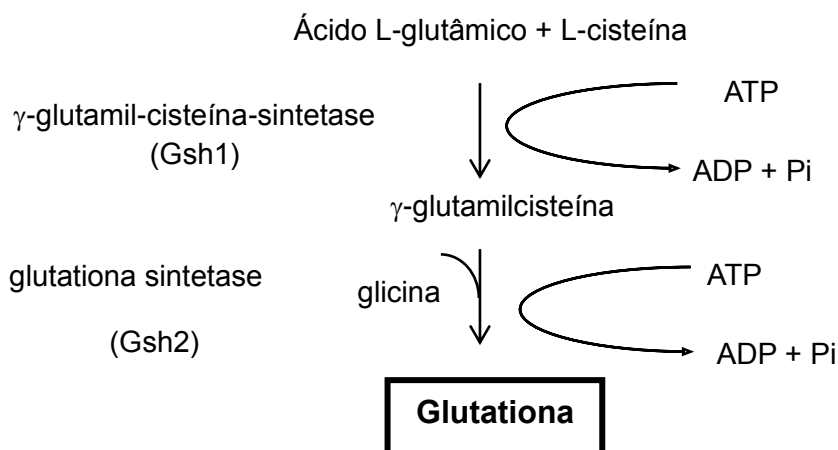


Figura 3 - Formação da glutathiona (adaptado de Grant 2001).

## **2.4 Sistema de desintoxicação de metais: o papel do vacúolo**

Uma vez no citosol, os metais pesados podem ter vários destinos: efluxo, quelatação ou compartimentação.

No caso da levedura *S. cerevisiae* existem duas vias de exportação de metais, caracterizadas em detalhe: Acr3p e Pca1p, que catalisam o efluxo de As (III) e Cd (II), respetivamente (Figura 4) (Wysocki e Tamás 2010).

A quelatação por peptídeos e proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteínas, como GSH e MT, respetivamente, conduz à formação de complexos, reduzindo a concentração de metal livre no citosol; são disso exemplo o Cd e Se (Gharieb e Gadd 2004). Adicionalmente, o complexo resultante pode ser o substrato para proteínas que medeiam a compartimentação no vacúolo (Wysocki e Tamás 2010). Vários compostos lipofílicos são conjugados com a GSH, sob a ação da enzima glutatona S-transferase (GST), antes de serem removidos do citosol (Grant 2001).

O transporte de metais, do citosol para o vacúolo, é um mecanismo comum de desintoxicação nas células eucariontes. Nas células, existem transportadores vacuolares que conduzem os metais conjugados com a glutatona, assim como compostos xenobióticos, para o interior do vacúolo. É disso exemplo o transportador vacuolar Ycf1p, pertencente à família de transportadores ABC, que transporta o cádmio para o vacúolo (Wysocki e Tamás 2010). Estes transportadores vacuolares conferem resistência e tolerância metálica nas leveduras. Desta forma, a fixação de metais no vacúolo pode ser vista como uma forma de regulação citosólica de iões. Outros exemplos de metais sequestrados no vacúolo são o cobalto, o magnésio, o níquel e o zinco (Ramsay e Gadd 1997; Wysocki e Tamás 2010). No caso dos metais tóxicos, a compartimentação no vacúolo impede a sua presença no citosol e, consequentemente, a manifestação dos efeitos tóxicos (Van der Heggen et al. 2010).

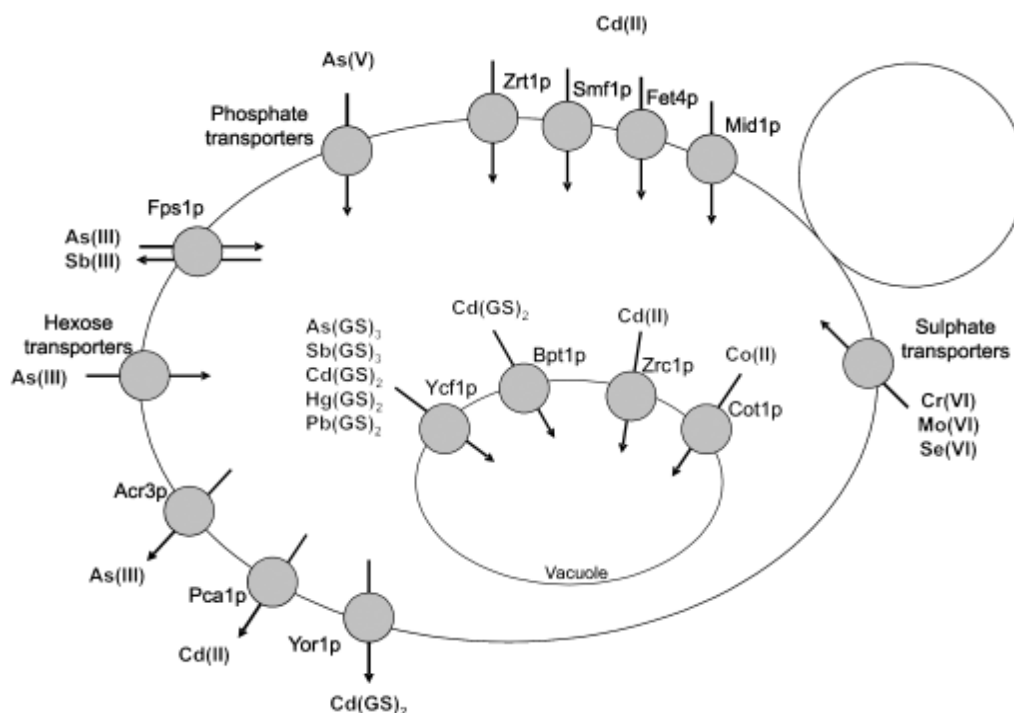


Figura 4 - Exemplo de transportadores que medeiam a acumulação e desintoxicação de metais tóxicos em *Saccharomyces cerevisiae* (Wysocki e Tamás 2010).

#### 2.4.1 V-ATPase: função e estrutura

A  $H^+$ -ATPase vacuolar (V-ATPase) é uma bomba de prótons presente nas células eucarióticas. Na levedura *S. cerevisiae*, a V-ATPase tem como função a acidificação do vacúolo. Este processo ocorre devido à translocação de prótons do citosol para o interior do vacúolo, sendo necessária a hidrólise de ATP citosólico pela V-ATPase (Figura 5) (Li e Kane 2009). O gradiente de prótons gerado, através da membrana vacuolar, pela ação da V-ATPase, é utilizado para o transporte de íons, aminoácidos e metabolitos para o vacúolo (Graham et al. 2000). No caso dos cátions metálicos, o transporte, através da membrana vacuolar, pode ocorrer por permuta do cátion por prótons, assegurado pelo gradiente eletroquímico transmembranar do vacúolo (Okorokov et al. 1985).

A V-ATPase da levedura é um complexo constituído por várias subunidades, organizadas em dois domínios: V0 (associado com a membrana) e V1 (periférico) (Figura 5). O domínio V0 é responsável pela translocação de prótons através da membrana, sendo constituído pelas subunidades a, d, c, c', c'' e e. As subunidades c, c' e c'' são proteínas hidrofóbicas designadas de proteolípido (Zhang et al. 2008). O domínio V1 é responsável pela hidrólise de ATP, sendo constituído pelas subunidades A-H. As subunidades A e B

desempenham um papel catalítico (hidrólise de ATP), enquanto que as subunidades E e G constituem as hastes periféricas (ligam as subunidades catalíticas à subunidade a do domínio V0 e estabilizam o complexo durante o processo de rotação). As subunidades D e F, fazem parte do rotor central, acoplando a energia libertada pela hidrólise de ATP, no setor catalítico, à rotação das subunidades c em relação à subunidade a (Figura 5) (Cipriano et al. 2008; Zhang et al. 2008).

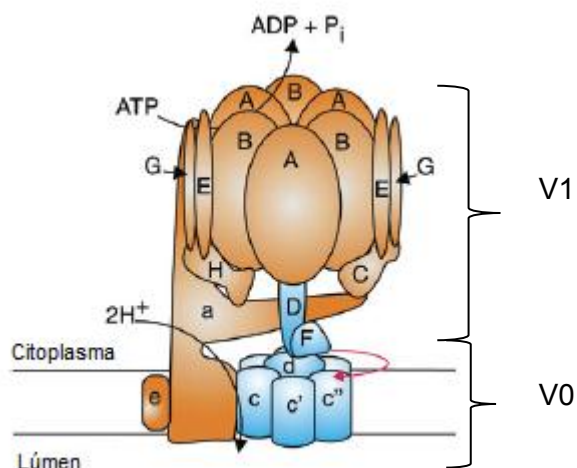


Figura 5 -  $H^+$ -ATPase vacuolar (V-ATPase). A V-ATPase é constituída pelo domínio associado com a membrana (V0) e o domínio citosólico (V1). A hidrólise de ATP no domínio V1 origina a translocação de protões através do domínio V0 (adaptado de Cipriano et al. 2008).





## **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**



## 2.1 Microrganismos utilizados

As estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na presente dissertação encontram-se listadas na Tabela 2. A estirpe BY4741 foi usada como controlo; as estirpes  $\Delta gsh1$  e  $\Delta gsh2$  foram usadas para investigar o papel da glutatona; as estirpes  $\Delta vps16$ ,  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$  foram utilizadas para avaliar o papel do vacúolo. Todas as estirpes foram obtidas da EUROSCARF (Frankfurt, Alemanha).

Tabela 2 – Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na presente dissertação.

Estirpe	Genótipo	Comentário
<b>BY4741</b>	(MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0)	Estirpe controlo
<b><math>\Delta gsh1</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YJL101c::kanMX4	Deficiente de $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase
<b><math>\Delta gsh2</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YOL049w::kanMX4	Deficiente de glutatona sintetase
<b><math>\Delta vps16</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YPL045w::kanMX4	Sem presença detetável de vacúolo
<b><math>\Delta vma1</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YDL185w::kanMX4	Sem a subunidade catalítica A da V-ATPase
<b><math>\Delta vma2</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YBR127c::kanMX4	Sem a subunidade catalítica B da V-ATPase
<b><math>\Delta vma3</math></b>	Isogénica de BY4741 excepto YEL027w::kanMX4	Sem a subunidade c (proteolípido) da V-ATPase

## 2.2 Condições de crescimento dos microrganismos

As estirpes foram armazenadas a 4°C, em tubos contendo YEPD – agar (YEPD com 2% (m/v) de agar).

As pré-culturas foram obtidas fazendo crescer as diferentes estirpes em frascos de Erlenmeyer de 100 mL de capacidade, contendo 10 mL de meio de cultura (YEPD - extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glucose 2% (m/v)). Os matrizes foram colocados num agitador orbital, a 25°C e 150 rpm, durante 8 a 10h.

As culturas, em fase exponencial de crescimento, foram obtidas por inoculação de 40 ou 100 mL de meio líquido YEPD, em frasco Erlenmeyer com 100 ou 250 mL de capacidade respectivamente, utilizando o volume apropriado da pré-cultura de forma a se obter, após 15 a 16h, uma  $DO_{600} \sim 1$ . As culturas foram incubadas nas mesmas condições das pré-culturas.

### **2.3 Avaliação da toxicidade do chumbo**

As células, em fase exponencial de crescimento, foram removidas por centrifugação ( $2000 \times g$ , durante 5 minutos), em condições estéreis. Em seguida, as células foram lavadas (duas vezes) e dispersas em água desionizada estéril. Determinou-se a concentração celular presente na suspensão por leitura da absorvância a 600 nm, como descrito na secção 2.4, do capítulo materiais e métodos.

As células foram suspensas em tampão MES (10 mmol/L, pH 6,0), contendo 2% (m/v) de glucose, numa concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL. Em seguida, foi adicionado um volume apropriado de uma solução padrão de 2000 mg/L de  $Pb(NO_3)_2$  (Merck), ou água desionizada, de modo a se obter concentrações na gama de 0 – 1000  $\mu\text{mol/L}$ . Posteriormente, as suspensões celulares (10 mL), foram agitadas a 150 rpm, em frascos Erlenmeyer, de 100 mL de capacidade, a 25°C, durante 3h.

A viabilidade celular foi determinada através de plaqueamento em YEPD – agar. Para tal, retiraram-se, em duplicado, amostras de 1,00 mL no tempo 0h (referência) e após 3h de incubação, em duplicado, de cada matraz, para tubos de ensaio contendo 9,00 mL de EDTA (3 mmol/L) estéril. Subsequentemente, foram efetuadas diluições sucessivas, em 9,00 mL de água desionizada estéril e efetuado o plaqueamento em YEPD – agar (duas réplicas de 200  $\mu\text{L}$  da diluição conveniente). O número de unidades formadoras de colónias (UFC) foi determinado após três a cinco dias de incubação a 25°C. A viabilidade celular foi calculada usando o número de UFC no tempo zero (100%). Em alternativa, foi efetuado o plaqueamento, em YEPD – agar, de 5  $\mu\text{L}$  de diluições sequenciais. O crescimento ocorreu durante 3-5 dias, a 25°C.

### **2.4 Determinação do número de células**

Para determinação do número de células usaram-se amostras de 100 ou 200  $\mu\text{L}$  e adicionou-se água desionizada até perfazer um volume de 2000  $\mu\text{L}$ . Leu-se a absorvância a 600 nm e determinou-se o número de células através da equação 6.

$$N^{\circ} \frac{\text{células}}{\text{ml}} \times 10^6 = 20,237 \times DO_{600} - 0,1348 \quad (\text{Equação 6})$$

## 2.5 Determinação da produção de ROS

As células foram suspensas em tampão MES (10 mmol/L, pH 6,0), contendo 2% (m/v) de glucose, numa concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL. De seguida, adicionou-se H<sub>2</sub>DCFDA (numa concentração final de 20 µmol/L) e agitou-se no vortex. As suspensões foram incubadas durante 20 minutos, no escuro, a 25°C. Posteriormente, foi adicionado um volume apropriado de uma solução padrão de 2000 mg/L de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Merck) ou igual volume de água desionizada, de forma a obter-se concentrações de 0 e 1000 µmol/L.

A fluorescência foi medida num leitor de microplacas (PerkinElmer, Victor<sup>3</sup>), num comprimento de onda de excitação de 485/14 nm e de emissão 535/25 nm. O valor da fluorescência (unidade relativa de fluorescência – URF) foi corrigido subtraindo o valor de autofluorescência do tampão, chumbo, células e H<sub>2</sub>DCFDA.

Na análise por microscopia de fluorescência, as células foram tratadas como acima descrito e observadas em microscópio equipado com um sistema de filtro GFP (Leica). As imagens foram adquiridas usando uma câmara Leica DC 300F e processadas usando *software* Leica IM50.

## 2.6 Avaliação da toxicidade do chumbo após tratamento das células com iodoacetamida

As células, em fase exponencial de crescimento, foram removidas, lavadas e avaliada a sua concentração celular como descrito na secção 2.4, do capítulo materiais e métodos. Posteriormente, as células foram suspensas numa solução aquosa de 1 mmol/L de iodoacetamida, em condições estéreis, numa concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL. A suspensão celular (50 mL) foi agitada a 150 rpm, em frasco Erlenmeyer, a 25°C, durante 1h, no escuro.

Após 1h de incubação, as células tratadas com iodoacetamida foram removidas por centrifugação (2000 x g, durante 5 minutos), em condições estéreis. Em seguida, as células foram lavadas (duas vezes) e dispersas em água desionizada estéril. Determinou-se a concentração celular por leitura da absorvância a 600 nm, como descrito na secção 2.4, do capítulo materiais e métodos. De seguida, procedeu-se de igual forma ao descrito na secção

2.3 e 2.5, do capítulo materiais e métodos, para a determinação da viabilidade e a produção de ROS, respetivamente.

## **2.7 Avaliação da toxicidade após tratamento das células com uma mistura de aminoácidos constituintes da GSH**

As células, em fase exponencial de crescimento, foram removidas, lavadas e avaliada a sua concentração celular como descrito na secção 2.4, do capítulo materiais e métodos. Posteriormente, as células, numa concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL, foram suspensas numa mistura contendo 0,5 mol/L de glucose, 0,01 mol/L de  $MgCl_2 \cdot H_2O$ , 0,02 mol/L de ácido L-glutâmico, 0,02 mol/L de glicina e 0,02 mol/L de cisteína em 0,1 mol/L de tampão fosfato (pH 7,4), em condições estéreis. A suspensão celular (50 mL) foi agitada a 150 rpm, em frasco Erlenmeyer, a 25°C, durante 1h, no escuro.

Após 1h de incubação, as células tratadas com solução de enriquecimento contendo glucose foram removidas por centrifugação (2000 x g durante 5 minutos), em condições estéreis. Em seguida, as células foram lavadas (duas vezes) e dispersas em água desionizada estéril. Determinou-se a concentração celular presente na suspensão por leitura da absorvância a 600 nm, como descrito na secção 2.4, do capítulo materiais e métodos. De seguida, procedeu-se de igual forma ao descrito na secção 2.3 e 2.5, do capítulo materiais e métodos, para a determinação da viabilidade e a produção de ROS, respetivamente.

## **2.8 Visualização do vacúolo**

O vacúolo foi visualizado utilizando a sonda fluorescente CMAC – Arg. A coloração foi efetuada de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante (Molecular Probes, Life Technologies).

## **2.9 Reprodutibilidade dos resultados**

Todas as experiências foram efetuadas, pelo menos, em duplicado. A medida de fluorescência, em cada experiência, foi efetuada em quadruplicado. Os resultados estão apresentados como a média de experiências e os respetivos desvios padrão com um limite de confiança de 95%.

## **Capítulo 3 – Resultados e Discussão**





### 3.1 Avaliação do papel da GSH

A glutathione parece desempenhar um papel chave na defesa contra o *stress* oxidativo e a toxicidade induzida por metais pesados (Wysocki e Tamás 2010). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel da GSH como mecanismo de defesa, na toxicidade induzida pelo chumbo na levedura *S. cerevisiae*.

#### 3.1.1 Efeito da deficiência dos genes *GSH1* e *GSH2* durante a exposição a chumbo

Dado que a GSH faz parte do sistema não enzimático das leveduras, na proteção contra o *stress* oxidativo, a viabilidade da estirpe selvagem (WT) de levedura *S. cerevisiae* foi comparada com estirpes mutantes, deficientes em GSH, quando sujeitas à exposição a várias concentrações de chumbo. A estirpe com deficiência no gene *GSH1* ( $\Delta gsh1$ ) está incapacitada de produzir o dipeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteína, uma vez que não possui o gene que codifica a enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase. A estirpe com deficiência no gene *GSH2* ( $\Delta gsh2$ ) não possui a enzima glutathione sintetase que adiciona a cisteína ao dipeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteína, ficando também, neste caso, comprometida a formação da GSH.

A exposição de *S. cerevisiae* a várias concentrações de chumbo induziu uma perda progressiva da capacidade de proliferação celular. Como controlo, as células foram incubadas durante 3h, na ausência de chumbo, não se tendo observado a perda de viabilidade celular. Verificou-se, ainda, que células deficientes no gene *GSH1* ou *GSH2* seguem o mesmo padrão de perda de viabilidade que as células da estirpe selvagem. Como se pode observar na figura 6, as células incubadas na ausência de metal apresentaram uma viabilidade de ~100%. À medida que se foi aumentando a concentração de chumbo observou-se uma maior perda de viabilidade celular. Verificou-se que para uma concentração de 250  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo, as células da estirpe selvagem e as células das estirpes mutantes apresentaram uma viabilidade entre 50 a 70%. Para 750  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo apenas 15 a 35% das células apresentaram capacidade para formar colónias em meio sólido YEPD e na situação mais drástica, em que as células foram incubadas na presença de 1000  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo, a viabilidade baixou para 11 a 13%. A perda da capacidade proliferativa das células expostas à presença de chumbo constitui um forte

indicador da toxicidade deste elemento.

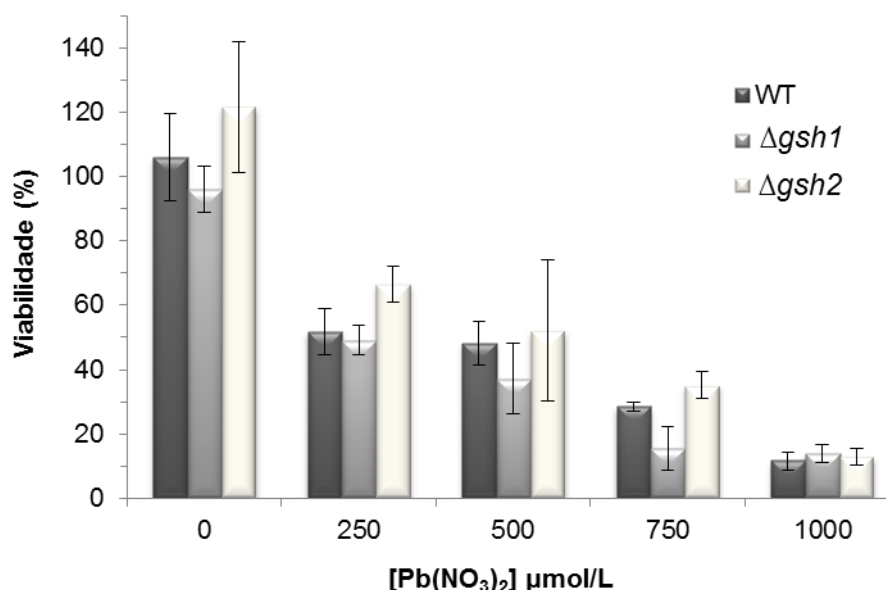


Figura 6 - Comparação da suscetibilidade ao chumbo da estirpe selvagem (WT) e mutantes deficientes em GSH ( $\Delta gsh1$  e  $\Delta gsh2$ ). As células, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas com diferentes concentrações de  $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. A viabilidade foi estimada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de cinco experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são um indicador de extrema importância na avaliação da toxicidade dos metais pesados. Para avaliar a capacidade de produção de ROS, após contato das células com chumbo, foi utilizado a sonda 2',7' - diclorofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ). Esta sonda não emite fluorescência quando quimicamente reduzida. Porém, após remoção dos grupos acetato, por esterases celulares, e na presença de  $H_2O_2$  é oxidada, exibindo fluorescência verde (Tarpey et al. 2004).

As células da estirpe WT, tratadas com 1000  $\mu mol/L$  de chumbo, durante 3h, exibem uma nítida fluorescência verde devido à acumulação intracelular de ROS (Figura 7d; Figura 8). Pelo contrário, não se observa a acumulação de ROS em células incubadas em tampão, durante 3h, na ausência de chumbo (controle), uma vez que as células permanecem não fluorescentes (Figura 7c). A quantificação da acumulação de ROS, nas estirpes WT e  $\Delta gsh1$ , revelou que a ausência de GSH não se traduziu num aumento de ROS (Figura 8).

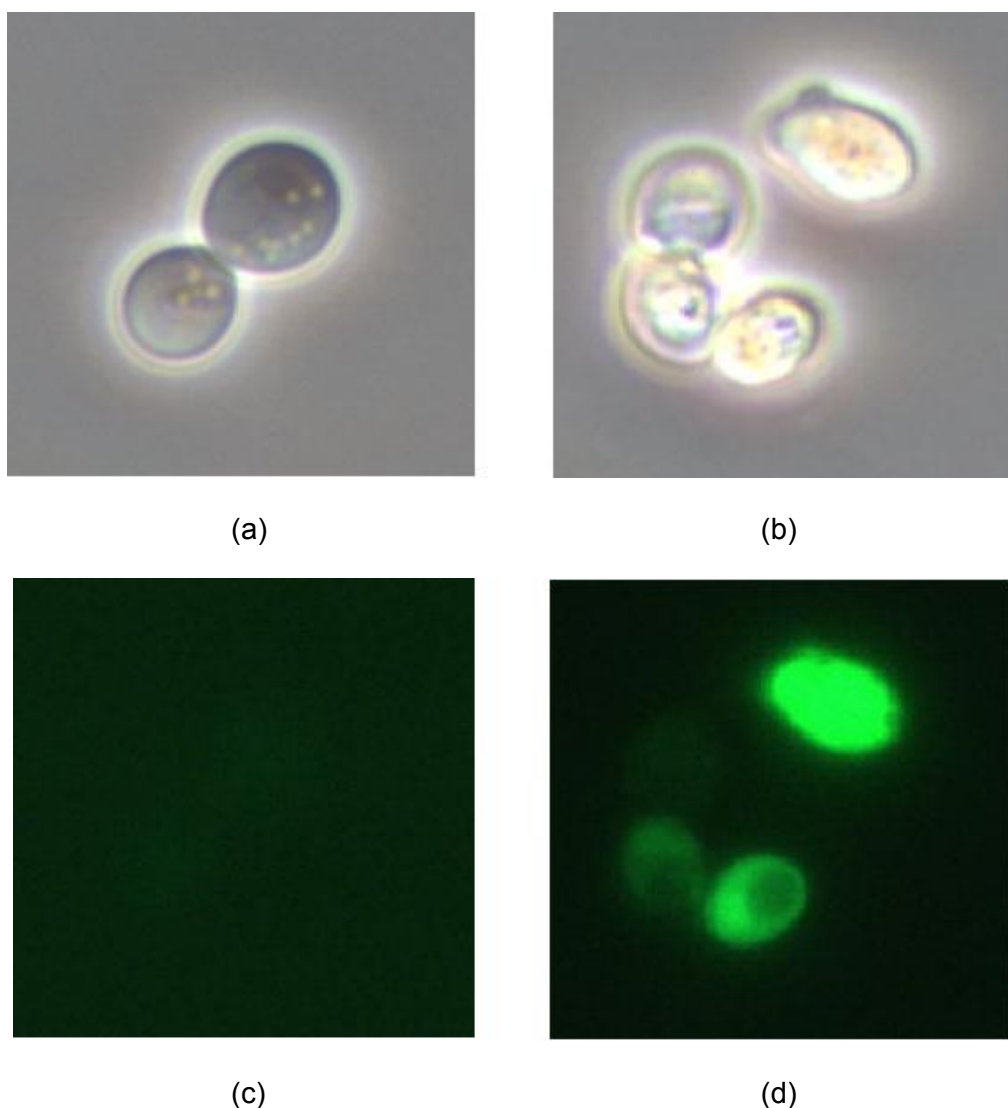


Figura 7 - Visualização da acumulação intracelular de ROS. As células de levedura selvagem (WT) foram incubadas com  $H_2DCFDA$ , durante 20 minutos, e posteriormente colocadas na ausência (a e c) ou na presença (b e d) de  $1000 \mu mol/L$  de  $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. Fotografias de fluorescência (c e d); fotografias de contraste de fase das mesmas células (a e b).

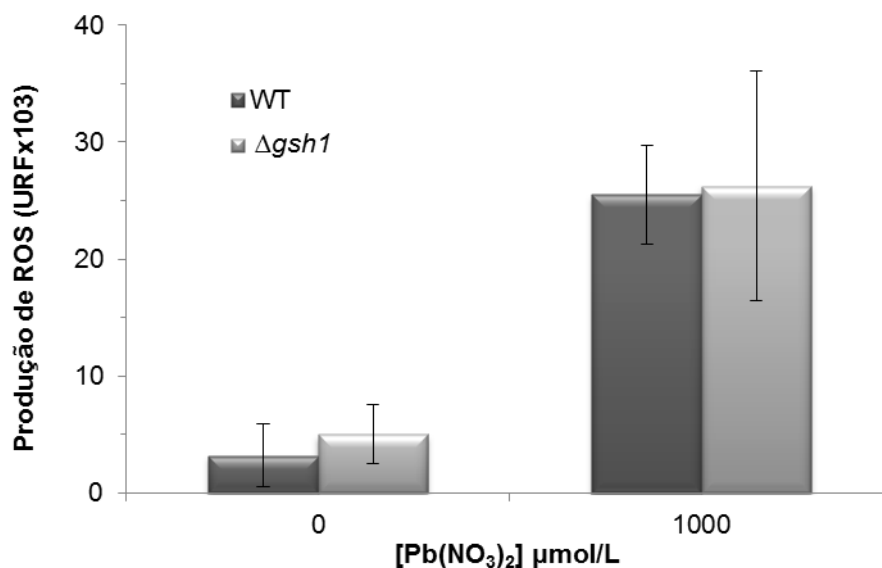


Figura 8 - Produção de ROS em células do tipo selvagem (WT) e  $\Delta gsh1$ . As células foram incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA, durante 20 min, e posteriormente colocadas na ausência ou na presença de 1000  $\mu mol/L$  de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, durante 3h. Os valores apresentados correspondem à média de quatro medidas de fluorescência; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida duas vezes.

As ROS podem causar danos numa grande variedade de moléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos e como tal torna-se difícil determinar quais os acontecimentos que estão na origem da perda de viabilidade celular (Perrone et al. 2008). Contudo, foi sugerido que a elevada produção de ROS pode estar na origem da perda de capacidade de proliferação das células expostas ao chumbo (Bussche e Soares 2011).

Sendo a GSH um mecanismo protetor, seria de se esperar que as células da estirpe selvagem produzissem uma menor quantidade de ROS do que as células sem GSH ( $\Delta gsh1$ ). No presente estudo, observou-se que a GSH também não foi capaz de proteger as células do *stress* oxidativo provocado pelo chumbo, assim como também não foi capaz de as proteger contra a perda de viabilidade induzida por este metal.

Perante os resultados obtidos, colocam-se duas incertezas no que diz respeito ao efeito protetor da GSH na toxicidade induzida por chumbo. A GSH poderá não ser um mecanismo de grande importância para a proteção celular, ou a quantidade de GSH, presente nas células, poderá não ser suficiente para minimizar o efeito tóxico do chumbo.

### **3.1.2 Tratamento com iodoacetamida e aminoácidos constituintes da GSH**

Está descrito que a GSH está envolvida na desintoxicação de vários metais, tais como o Cd e o Se, complexando-os e, conseqüentemente, diminuindo a sua disponibilidade de se ligar aos grupos sulfidrilo das enzimas (Gharieb e Gadd 2004).

Para melhor esclarecer o papel da GSH, no mecanismo de proteção celular, foi realizado um estudo no qual se trataram as células da estirpe WT, com iodoacetamida ou com uma mistura de aminoácidos constituintes da GSH, durante 1h, a 25°C, antes de serem expostas a diferentes concentrações de chumbo. A iodoacetamida é um agente alquilante, que se liga covalentemente aos grupos sulfidrilo (Hansen e Winther 2009). As células foram tratadas com este reagente com o intuito de causar a depleção de GSH e, conseqüentemente, diminuir a capacidade de proteção celular. A mistura de enriquecimento de aminoácidos (ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina) constituintes da glutathione, foi adicionada com o intuito de aumentar a concentração de GSH, fortalecendo o mecanismo de defesa das leveduras. O aumento ou a diminuição da concentração deste tripeptídeo, no meio intracelular, poderá aumentar ou diminuir a capacidade antioxidante das células (Berno et al. 2010).

As células tratadas com iodoacetamida apresentaram uma sensibilidade aumentada à presença de chumbo. Após uma adição de 500  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e em comparação com as células não tratadas (controle), ocorreu uma diminuição da viabilidade celular. Aumentando para o dobro a concentração de chumbo, observou-se que a maior parte das células ficaram incapacitadas de formar colônias em meio YEPD sólido (Figura 9); ou seja, menos de 1% das células sobreviveram. Encontra-se descrito na literatura que o tratamento, de leveduras, com 1 mmol/L de iodoacetamida, durante 1h, provoca uma redução superior a 95% do valor de GSH (Millard et al. 1997). A iodoacetamida liga-se, covalentemente, aos grupos sulfidrilo; deste modo, para além da redução da GSH, o tratamento com iodoacetamida provoca, provavelmente, uma inibição irreversível das enzimas associadas com a defesa contra o *stress* oxidativo. Este fato poderá explicar a grande sensibilidade à presença de chumbo das células tratadas com iodoacetamida.

Observou-se uma situação inversa, quando se enriqueceu as células WT com uma mistura de aminoácidos que constituem a GSH. Este tratamento promoveu, claramente, um efeito protetor sobre as células. Após uma adição de 500  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , a viabilidade celular aumentou ~30%, em comparação com células que não sofreram qualquer tratamento (Figura 9). No caso da adição de 1000  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo, o efeito protetor aumentou cerca

de 44% (Figura 9); ou seja, metade da população sobreviveu após 3h de contato com o tóxico. Estes resultados devem-se, provavelmente, ao enriquecimento em GSH. Encontra-se descrito na literatura que o tratamento de células de levedura com uma mistura de aminoácidos que constitui a GSH, aumenta a concentração intracelular de GSH (Izawa et al. 1995).

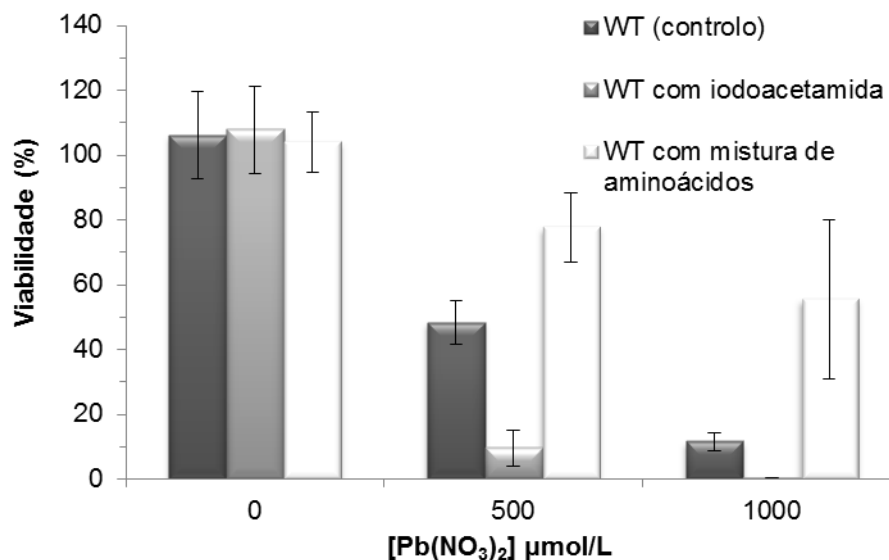


Figura 9 - Impacto de iodoacetamida e uma mistura de enriquecimento contendo os aminoácidos constituintes da GSH na viabilidade das células expostas a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. As células da estirpe selvagem (WT), em fase exponencial de crescimento, foram incubadas com 1 mmol/L de iodoacetamida ou com uma mistura que contém glucose, ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina, durante 1h, a 25 ° C, antes da exposição a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, durante 3h. Os valores apresentados correspondem à média de três experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

Estudou-se também o impacto da iodoacetamida e da mistura de aminoácidos constituintes da GSH, na acumulação intracelular de ROS, em células expostas a Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

As células da estirpe WT tratadas com iodoacetamida apresentaram valores mais elevados de ROS do que as respectivas células não tratadas (Figura 10). Pelo contrário, as células de estirpe WT, quando incubadas com ácido L-glutâmico, L-cisteína e glicina, apresentam valores inferiores de ROS (comparativamente com as células não tratadas) quando expostas a 1000 μmol/L de chumbo (Figura 10).

Os resultados obtidos evidenciam, claramente, que a manipulação do conteúdo intracelular de GSH modifica, profundamente, a sensibilidade das células ao efeito tóxico do chumbo.

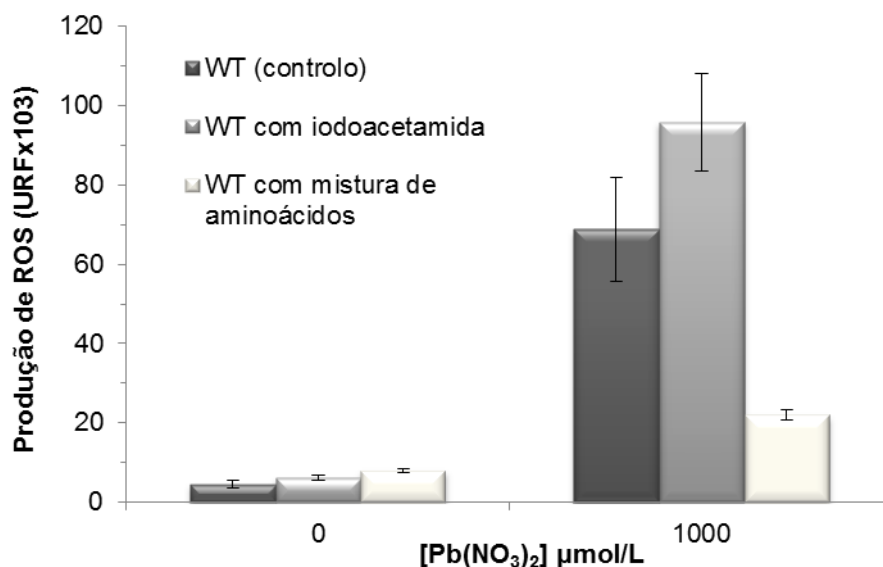


Figura 10 - Impacto da iodoacetamida e de uma mistura de aminoácidos constituintes da GSH na acumulação intracelular de ROS em células expostas a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . As células da estirpe selvagem (WT), foram tratados e expostos a  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , tal como descrito na figura 9. A produção de ROS foi avaliada com  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , como descrito na figura 8. Os valores apresentados correspondem à média de quatro leituras de fluorescência; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais). A figura é uma representação típica de uma experiência repetida quatro vezes.



### 3.2 Avaliação do papel do vacúolo

Numa segunda fase, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel do vacúolo, como mecanismo de defesa, contra a toxicidade induzida pelo chumbo usando como modelo a levedura *S. cerevisiae*.

O vacúolo (Figura 11a) parece desempenhar um importante papel na desintoxicação de metais, através da regulação citosólica do metal, por compartimentação no seu interior (Wysocki e Tamás 2010). Um dos mecanismos de transporte dos metais, através da membrana vacuolar, consiste na troca catião-protão, assegurado pela ação da V-ATPase (Graham et al. 2000).

Para estudar o efeito do vacúolo das leveduras, como mecanismo de defesa, utilizaram-se estirpes mutantes, sem vacúolo ou deficientes na estrutura da V-ATPase. A estirpe  $\Delta vps16$  não possui vacúolo (Figura 11b), impedindo que os metais se acumulem no seu interior. Por sua vez, as estirpes  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$  possuem a estrutura da V-ATPase modificada, impedindo que esta exerça o seu papel de regulação do vacúolo. As estirpes  $\Delta vma1$  e  $\Delta vma2$  não possuem as subunidades catalíticas A e B do domínio V1, respetivamente, enquanto que  $\Delta vma3$  não possui a subunidade c do domínio V0, designado de proteolípido.

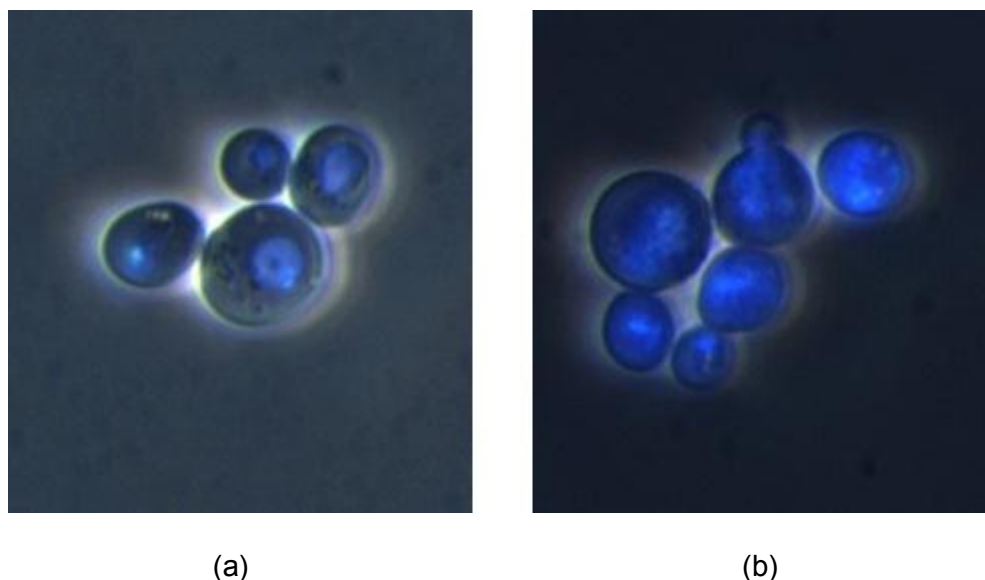


Figura 11 – Visualização do vacúolo utilizando a sonda CMAC-Arg. Células da estirpe selvagem (WT) (a) e células da estirpe  $\Delta vps16$  (sem vacúolo) (b).

A exposição do mutante que não apresenta qualquer estrutura do tipo vacuolar ( $\Delta vsp16$ ), a várias concentrações de chumbo (100, 250 e 500  $\mu\text{mol/L}$ ), induziu a perda progressiva da viabilidade celular, demonstrada pela incapacidade de formar colónias em meio sólido YEPD. Tendo como referência a estirpe selvagem (WT), observa-se que o mutante  $\Delta vsp16$  apresenta uma sensibilidade muito aumentada ao efeito tóxico do chumbo. Quando as células  $\Delta vps16$  são expostas a 100  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo, observa-se uma mortalidade de ~80%. Aumentando a concentração de exposição para 250  $\mu\text{mol/L}$ , verifica-se uma mortalidade de ~99%. Verificou-se que o efeito tóxico do chumbo se acentua quanto mais elevada for a concentração de tóxico. Ao expor-se as células mutantes a 500  $\mu\text{mol/L}$ , a taxa de mortalidade foi superior a 99,8%; ou seja, apenas sobreviveram menos de 0,2% das células (Figura 12).

No que diz respeito às células das estirpes deficientes na estrutura da V-ATPase, verifica-se que apresentam maior sensibilidade ao efeito tóxico do chumbo comparativamente à estirpe WT; porém, são menos sensíveis do que as células da estirpe  $\Delta vps16$ . Observa-se que as células mutantes nas subunidades de V-ATPase quando incubadas na presença de 100  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo apresentam uma taxa de viabilidade entre 33 a 40% (Figura 12). Porém, quando se aumenta a concentração de chumbo para 250  $\mu\text{mol/L}$ , a morte celular acentuasse, sobrevivendo, apenas entre 11 a 25% da população (Figura 12). No caso mais drástico, após adição de 500  $\mu\text{mol/L}$  de chumbo, verifica-se que mais de 95% das células são incapazes de formar colónias em meio YEPD sólido (Figura 12). Estes resultados sugerem que não existe uma diferença importante entre os mutantes que possuem a função da V-ATPase comprometida.

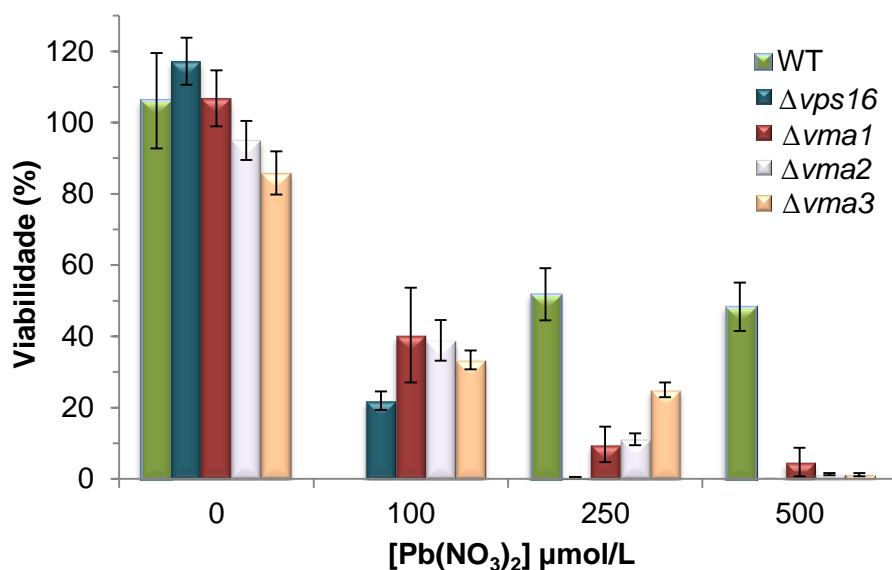


Figura 12 - Comparação da suscetibilidade ao chumbo da estirpe selvagem (WT) e estirpes mutantes vacuolares ( $\Delta vps16$ ,  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$ ). As células em fase exponencial de crescimento foram tratadas com diferentes concentrações de  $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h. A viabilidade foi estimada por contagem de unidades formadoras de colónias (UFC). Os valores apresentados correspondem à média de quatro experiências independentes; os desvios padrão estão apresentados com um limite de confiança de 95% (barras de erro verticais).

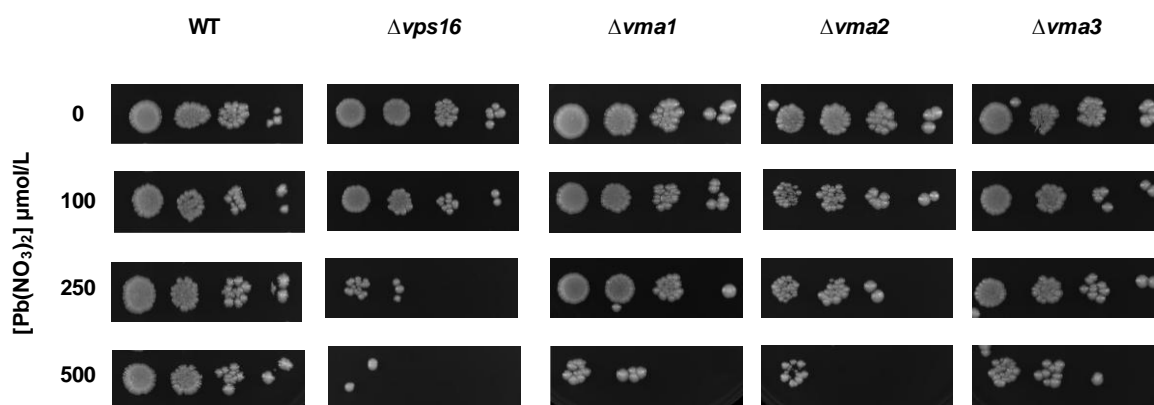


Figura 13 – Avaliação da suscetibilidade ao chumbo em estirpe selvagem (WT) e estirpes mutantes vacuolares ( $\Delta vps16$ ,  $\Delta vma1$ ,  $\Delta vma2$  e  $\Delta vma3$ ). As células, em fase exponencial de crescimento, foram tratadas com diferentes concentrações de  $Pb(NO_3)_2$ , durante 3h e efetuado o plaqueamento, em YEPD – agar, de 5 μL de diluições sequenciais. O crescimento ocorreu durante 3-5 dias, a 25°C.

Os resultados obtidos sugerem, claramente, que a compartimentação do chumbo no vacúolo é um processo de extrema importância na defesa contra a toxicidade deste metal, uma vez o mutante  $\Delta vps16$  (sem estrutura do tipo vacuolar) apresenta uma elevada sensibilidade ao efeito tóxico do chumbo, comparativamente à estirpe selvagem (WT). De referir, ainda, que a V-ATPase parece desempenhar um papel importante na compartimentação vacuolar do chumbo, uma vez que os mutantes deficientes nas subunidades apresentam uma perda de viabilidade bastante elevada, relativamente à estirpe selvagem



## **Capítulo 4 – Conclusões e trabalho futuro**



#### 4.1 Conclusões

No presente estudo avaliou-se o papel da glutathione e do vacúolo, como mecanismos de proteção contra a toxicidade provocada por chumbo em *Saccharomyces cerevisiae*. Dos resultados obtidos foi possível obter as conclusões abaixo apresentadas.

- A) Os mutantes deficientes nos genes *GSH1* ou *GSH2* não apresentam uma sensibilidade aumentada ao efeito tóxico de chumbo, avaliado através da capacidade de proliferação das células em YEPD agar e da produção de ROS.
- B) A manipulação da concentração intracelular de glutathione, por depleção (através do tratamento das células com iodoacetamida) ou enriquecimento (incubando as células na presença de glucose e dos aminoácidos que constituem a glutathione), afeta profundamente a sensibilidade das células de levedura ao efeito tóxico do chumbo. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem o envolvimento da glutathione na desintoxicação por chumbo. Contudo, a presença de glutathione, *per si*, parece não ser suficiente para impedir a perda de viabilidade e a indução de *stress* oxidativo provocada por chumbo.
- C) O vacúolo parece desempenhar um papel importante, como mecanismo de defesa contra a toxicidade provocada por chumbo, uma vez que uma estirpe mutante sem qualquer estrutura vacuolar apresenta uma elevada sensibilidade à presença de chumbo.
- D) A V-ATPase parece estar envolvida na compartimentação de chumbo no vacúolo. Mutantes deficientes nas subunidades catalíticas A ou B ou na subunidade c (proteolípido) da V-ATPase, apresentam uma maior sensibilidade à presença de chumbo, comparativamente à estirpe selvagem.



## **4.2 Sugestões para trabalho futuro**

No sentido de complementar e aprofundar o trabalho desenvolvido na presente dissertação, sugere-se, como trabalho futuro, o alargamento do estudo da importância da ATPase vacuolar, recorrendo a mutantes deficientes em outras subunidades da V-ATPase. Adicionalmente, sugere-se o estudo comparativo da acumulação de ROS na estirpe WT, no mutante  $\Delta vps16$  e em mutantes deficientes nas subunidades da V-ATPase.

## **Referências Bibliográficas**



- ATSDR (2007) Toxicological profile for lead. Agency for toxic substances disease registry (ATSDR) US Department of health and human services - Public health services
- Avery SV (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* 49: 111-142
- Avery SV (2011) Molecular targets of oxidative stress. *J Biol Chem* 434: 201-210
- Berno L, Poeta PT e Junior MRM (2010) Efeitos do selênio oriundo da torta de castanha-do-brasil sobre a concentração de glutathione reduzida (gsh) em ratos wistar. *Alim Nutr* 21: 231-239
- Bussche VJ e Soares EV (2011) Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 679-687
- Chen C e Wang JL (2007) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to lead ion stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:683-687
- Cheng H e Hu Y (2010) Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: A review. *Environ Pollut* 158:1134-1146
- Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J e Forgac M (2008) Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *BBA-Bioenergetics* 1777: 599-604
- Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Egwurugwu JN (2007) Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* 5: 112-118
- Gharieb MM e Gadd GM (2004) Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 17: 183-188
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettlin H e Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-547
- Graham LA, Powell B e Stevens TH (2000) Composition and assembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase complex. *J Exp Biol* 203: 61-70
- Grant CM (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 39: 533-541
- Hansen RE e Winther JR (2009) An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides reactions, reagents, and practical considerations. *Anal Biochem* 394: 147-158

- Herrero E, Ros J, Belli G e Cabiscol E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *BBA* 1780: 1217-1235
- Izawa S, Inoue Y e Kimura A (1995) Oxidative stress response in yeast: effect glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 368: 73-76
- Li SC e Kane PM (2009) The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *BBA-Mol Cell Res* 1793: 650-663
- Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527
- Jomova K e Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65-87
- Millard PJ, Roth BL, Thi HPT, Yue ST e Haugland RP (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeast. *Appl Environ Microbiol* 63: 2897-2905
- Mariani D (2008) Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a cisplatina no modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRJ, Rio de Janeiro
- Moreira FR e Moreira JC (2004) Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publica* 15: 119-29
- Okorokov LA, Kulakovskaya TV, Lichko LP e Polorotova EV (1985). H<sup>+</sup>/ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett* 192: 303-306
- Perrone GG, Tan S e Dawes IW (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *BBA* 1783: 1354-1368
- Ramsay LM e Gadd GM (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett* 152: 293-298
- Rodrigues PO e Morais MG (2002) Radicais Livres e Sistemas Antioxidantes. Em: Rodrigues PO e Morais MG (ed), *Bioquímica Humana - Química Orgânica e Física*. McGraw-Hill de Portugal, Lda, 327-347

- Sakamoto F, Ohnuki T, Fujii T e Iefuji H (2010) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to heavy element stress: lead vs. uranium. *Geomicrobiol J* 27: 240-244
- Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol Med* 27: 916-921
- Soares EV, Duarte APSR, Boaventura RA e Soares HMVM (2002) Viability and release of complexing compounds during accumulation of heavy metals by a brewer's yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 836–841
- Soares EV, Hebbelinck K e Soares HMVM (2003) Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can J Microbiol* 49: 336–343
- Stahlschmidt MF (2010) Estudo do processo de recozimento em linha de galvanização – caracterização e implicações inerentes ao arraste de chumbo. Dissertação para obtenção de Título de Mestre em Engenharia, Porto Alegre
- Suh JH, Yun JW e Kim DS (1999) Cation ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) exchange in  $Pb^{2+}$  accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng* 21: 383–387
- Tarpey MM, Wink DA e Grisham MB (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: 431–444
- US-EPA (2006) National recommended water quality criteria. United States Environmental Protection Agency EPA. Office of Water, Science and Technology (4304T), Washington, DC
- Van der Heggen M, Martins S, Flores G e Soares EV (2010) Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 1355-1361
- Viau CM (2005) Efeitos tóxicos e genotóxicos do cloreto de estanho ( $SnCl_2$ ) em bactéria e levedura. Dissertação para programa de Pós-Graduação Em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre
- Wysocki R e Tamás MJ (2010) How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* 34: 925-951
- Yuan XF e Tang CC (1999) DNA damage and repair in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells exposed to lead. *J Environ Sci Health Part A-Toxic/Hazard Subst Environ Eng* 34: 1117–1128

Zhang Z, Zheng Y, Mazon H, Milgrom E, Kitagawa N, Kish-Trier E, Heck AJR, Kane PM e Wilkens S (2008) Structure of the yeast vacuolar ATPase. J Biol Chem 283: 35983–35995

